

Е.В. Зиновьев<sup>1</sup>, Р.Р. Рахматуллин<sup>2</sup>, А.В. Апчел<sup>1</sup>,  
К.Ф. Османов<sup>1</sup>, И.А. Алмазов<sup>1</sup>, А.А. Сулица<sup>1</sup>

## Матрица биоинженерных конструкций на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Оренбургский государственный университет, Оренбург

**Резюме.** Пластические материалы с живыми клетками являются основой для создания биоинженерных конструкций. Предложенный нами биопластический материал на основе структурированной гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса является перспективным с точки зрения культивирования клеток кожи. Установлено, что материал обладает необходимыми условиями для обеспечения адгезии, миграции и пролиферации фибробластов и кератиноцитов, которые распределяются и остаются жизнеспособными как на поверхности, так и в межклеточном веществе биополимера. Одновременное культивирование кератиноцитов и фибробластов на матрице демонстрирует трёхмерное распределение данных клеток по всей структуре биополимера. При культивировании фибробластов в культуральной среде с помощью иммуноферментного анализа к третьим суткам выявлено достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение на 33,8% секреции клетками фактора роста кератиноцитов. Биопластический материал на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты, пептидного комплекса, коллагена I типа и адгезивного пептида аргинин-глицин-аспарагин можно рассматривать в качестве перспективного для создания биоинженерной конструкции – живого эквивалента кожи.

**Ключевые слова:** гиалуроновая кислота, пептидный комплекс, биоинженерные конструкции, культивирование клеток кожи, фибробласты, кератиноциты, секреция цитокинов, живой эквивалент кожи.

**Введение.** На современном этапе развития реконструктивной хирургии и дерматологии одной из первоочередных задач является разработка и внедрение в практику методик тканевой инженерии, при этом создание тканевых эквивалентов и искусственных органов требует поиска универсальных либо тканеспецифичных биопластических матриц-носителей живых клеток [4, 8–10].

Пластические материалы с живыми клетками являются основой для создания тканеинженерных конструкций (ТИК), обладающих рядом преимуществ с использованием суспензий культур клеток. Во-первых, в ТИК повышается выживаемость и ограничивается миграция клеток в трансплантате. Во-вторых, клетки на поверхности носителя более активно пролиферируют, синтезируют межклеточное вещество, сигнальные молекулы, обеспечивая прорастание ТИК соединительной тканью и капиллярами. В-третьих, материал носителя выступает в качестве объемобразующего агента (матричной конструкции), содержащего рекомбинантные факторы роста, стволовые/прогениторные клетки, являющиеся индукторами ангиогенеза и регенерации. Все эти обстоятельства обеспечивают высокую эффективность применения ТИК не только в реконструктивной и восстановительной хирургии [9, 10], но и в дерматологии.

Для создания ТИК используют природные и синтетические полимеры (коллаген, целлюлоза, альгиновые кислоты, хитин, полимолочная кислота, а также гиалуроновая кислота (ГК). На основе полимеров получают

гидрогели, которые в комбинации со сшивающими катионами формируют инъекционные средства для сайт-специфической доставки клеток (стромальных клеток, хондроцитов) и некоторых ростовых факторов [6]. Именно ГК (несульфированный гликозаминогликан внеклеточного матрикса соединительной, эпителиальной и нервной тканей) считается наиболее перспективной матрицей для создания ТИК [11–14]. Данный полимер – естественный компонент межклеточного аморфного матрикса, обладающий способностью к пространственной ориентации макромолекул и формированию амортизационного объема. Благодаря своим уникальным физико-химическим (гидрофильность, мультиполярность, иммунологическая толерантность) и стеарическим свойствам коллоиды на основе ГК создают оптимальную внеклеточную среду для функционирования клеток [5, 15].

Ранее предложенный нами [1–3] биопластический материал представляет собой структурированный в виде пленки полимер ГК и пептидного комплекса (ПК), в матрицу которого (для культивирования) дополнительно введены компоненты внеклеточного матрикса (коллагена I типа и адгезивный пептид Arg-Gly-Asp), являющиеся «якорными» молекулами для адгезии и миграции клеток [5, 15]. Структура полимера сохраняет стабильность физико-химических параметров во влажной среде, обладает физико-химическими свойствами, перспективными с точки зрения возможного клеточного культивирования.

**Цель исследования.** Обоснование возможности культивирования клеток кожи на разработанной матрице из ГК и ПК.

**Материалы и методы.** Матрица из ГК и ПК представляет собой тонкую хрупкую полупрозрачную пленку беловатого цвета, стерильную, хорошо смачиваемую жидкостями [2, 3]. Ее структура (ячеистая, волокнистая, непрозрачная) определяет невозможность визуализации живых клеток при микроскопии без предварительной окраски. Матрица имеет две разные поверхности: гладкую, обращенную к внешней среде и шероховатую, обращенную к ране. Жизнеспособность, поведение и гистохимические особенности колоний фибробластов и кератиноцитов на матрице из ГК и ПК, а также фибринового геля (контроль) оценивали на разных сроках культивирования – спустя 0,5, 1, 2, 3 ч, а также к исходу 1–25 суток после посева. Фибробласты и кератиноциты кожи человека получены из кожи здоровых доноров. Первые получали путем механического или ферментативного измельчения кожи с последующим стандартным культивированием в среде Dulbecco modified Eagle’s medium [7]. Вторые выделяли ферментативным методом с использованием смеси диспазы и коллагеназы, культивировали в среде с физиологическим содержанием  $Ca^{2+}$  и в присутствии митогенов. Клетки высевали на шероховатую поверхность матрицы.

Для формирования трехмерных эквивалентов кожи в качестве дермального компонента использовались матрицу ГК и ПК и фибриновый гель (контроль), заселенные фибробластами. Фибриновый гель получали из плазмы крови человека при добавлении хлорида кальция. Фибробласты вносились в гель или на матрицу в концентрации 100 тыс /мл. На следующие сутки на поверхность эквивалентов высевались клетки первичной культуры кератиноцитов в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл.

Жизнеспособность клеток кожи на матрице оценивали до 25 суток культивирования, клетки окрашивали 3-[4,5-диметилiazол-2ил]-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ) [7]. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по кривым роста. Клетки высевали на чашки Петри диаметром 3 см в концен-

трации 2,5 тыс/см<sup>2</sup>, в определенные сроки (1, 4 и 6 сутки) снимали раствором 0,25% трипсина и подсчитывали количество клеток. Вычисляли показатели пролиферативной активности: количество удвоений популяции, время удвоения популяции. Оценивали две разные линии фибробластов разных доноров (фибробласты F 006 и F007) .

Для изучения морфологии и распределения фибробластов и кератиноцитов на матрице парафиновые срезы окрашивались гематоксилином/эозином, проведено иммуногистохимическое окрашивание тканей на виментин-маркер соединительнотканых клеток (фибробластов) и панцитокератин (маркер эпителиальных клеток). Использовали антитела к панцитокеартину (primary antibody multi-cytokeratin AE1/AE3), виментину (primary antibody vimentin SRL 33). Гистохимическое исследование проводили с использованием полимера novolink min polymer detection system, Соединенные Штаты Америки (США) с добавлением хромогена (диаминобензидин).

Секрецию ростовых факторов и цитокинов в среде культивирования оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа. Использовали тест-системы определения фактора роста кератиноцитов (human KGF quantikine ELISA Kit, R@D, США), фактора роста гепатоцитов (human HGF QUANTIKINE ELISA Kit, R@D, США) интерлейкина (ИЛ) 6 и 10 фирмы «Цитокин» (Россия). Концентрация цитокинов определялась в среде культивирования клеток на 1-е и 3-и сутки наблюдения. Клетки засеивали в концентрации: фибробласты 100 тыс/мл, кератиноциты 500 тыс/мл, кератиноциты на фидере из фибробластов 10 тыс/мл. Для контроля фона использовали питательную среду, а также инкубационную среду с матрицей без клеток.

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики.

**Результаты и их обсуждение.** Установлен факт миграции фибробластов на подложку из культурального пластика сквозь слой матрицы благодаря наличию пор в структуре полимера. Окраска МТТ позволяет визуализировать фибробласты на поверхности биополимера (рис. 1).

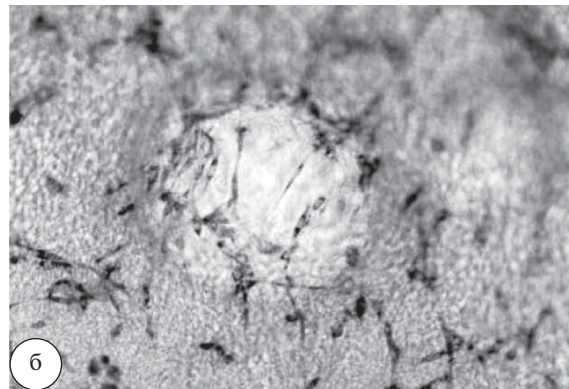
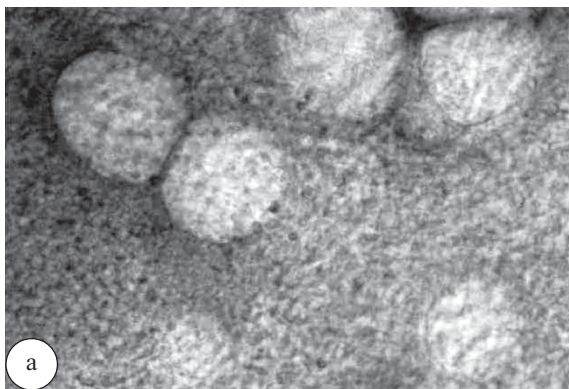


Рис. 1. Фибробласты кожи человека на матрице из ГК и ПК: а – без окраски, б – окраска МТТ, увел.  $\times 120$

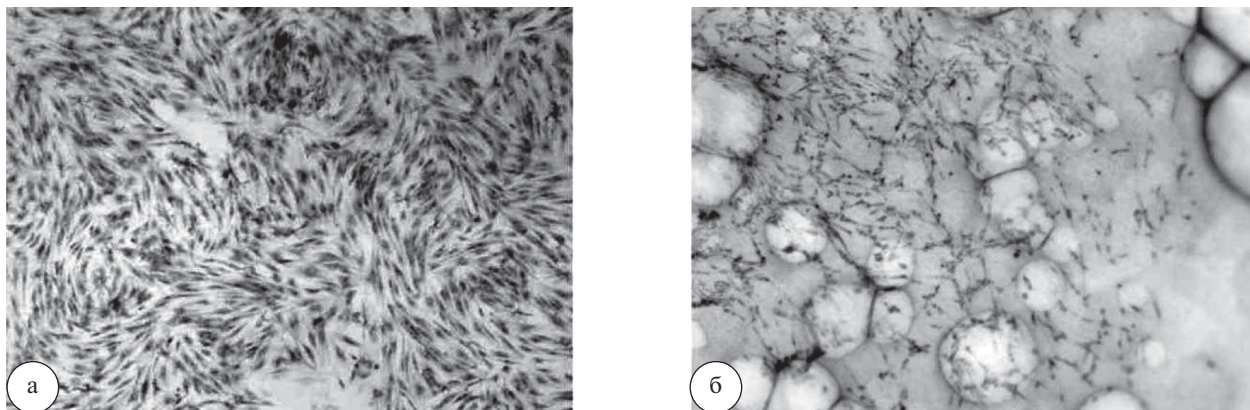


Рис. 2. Фибробласты кожи человека спустя 72 ч культивирования: а – на подложке из пластика; б – на матрице из ГК и ПК. Окраска МТТ, увел. ×200

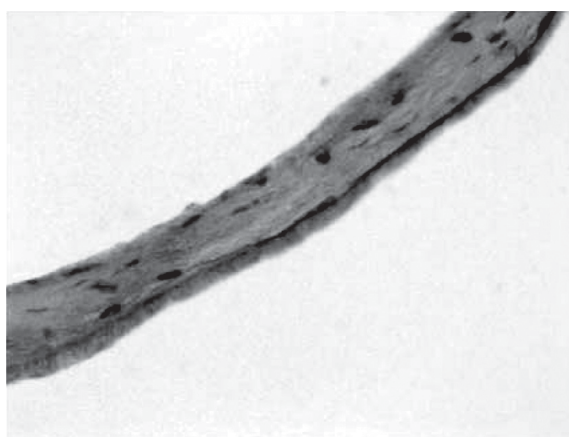
Вследствие взаимодействия клеточных рецепторов с элементами подложки происходит адгезия клеток с последующим их постепенным расплыванием. Общий характер прикрепления и расплывания фибробластов на матрице ГК соответствует поведению клеток на подложке из культурального пластика. Расплывание фибробластов на пластике и на матрице завершается уже к первому часу после переноса клеток, которые остаются живыми на протяжении всего периода наблюдения (рис. 2).

Установлено, что к 3-м суткам на поверхности фибринового геля фибробласты рассредоточены по всей его поверхности в виде монослоя, в матрице ГК и ПК они распределены не только по поверхности, но и в ее толще. При этом клетки внутри полимера живые, активно пролиферирующие, вытянутой формы (рис. 3).

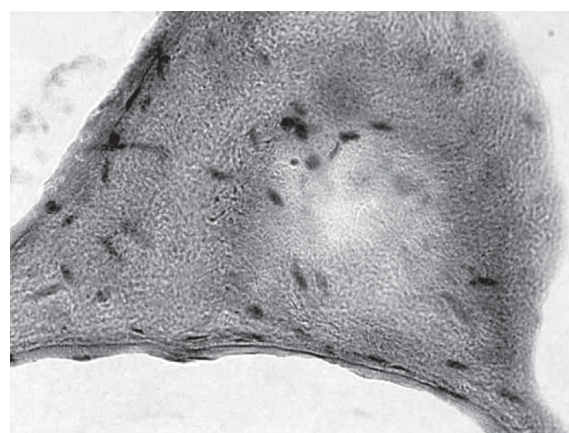
К 20-м суткам в матрице ГК и ПК фибробласты активно пролиферировали как на ее поверхности, так и в ее толще (рис. 4а). В этот же срок фибробласты, посеянные на фибриновый гель, были распределены

только по его поверхности и не проникали в межточное вещество геля (рис. 4б). На протяжении всего периода культивации плотность клеток прогрессивно увеличивалась как на поверхности, так и в структуре матрицы (рис. 5). Закономерно, что плотность фибробластов оказалась максимальной в поверхностных слоях полимера, их количество в глубоких слоях постепенно снижалось (рис. 6). Первичная культура кератиноцитов после пересадки на матрицу, содержащую фибробласты, в процессе создания живого эквивалента кожи представляла собой гетерогенную суспензию клеток на разных стадиях дифференцировки. Базальные кератиноциты сливались в отдельные агрегаты и формировали колонии, сливающиеся в единый пласт. Одновременно с пролиферацией происходили процессы дифференцировки, которые приводили к образованию многослойных пластов клеток (рис. 7).

Подсчет роста клеток на поверхности матрицы осуществлялся культуральным методом. Результаты оценки активности фибробластов линии F006 и F007



Продольный срез



Поперечный срез

Рис. 3. Матрица из ГК и ПК с фибробластами кожи, 3 сутки культивирования. Окраска гематоксилин-эозином, увел. ×200

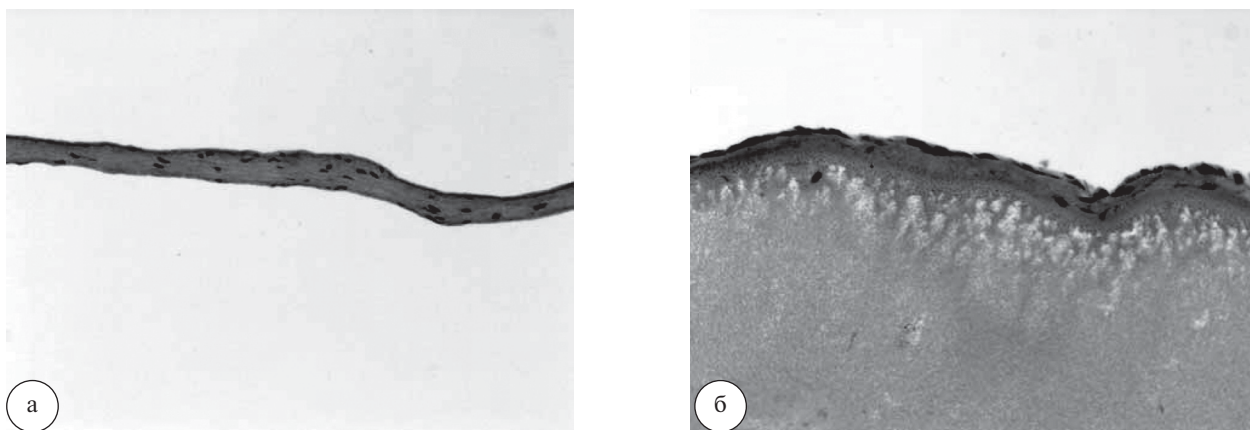


Рис. 4. Распределение фибробластов на 20-е сутки культивирования в структуре биополимера (а) и фибринового геля (б). Окраска гематоксилин-эозином, увел.  $\times 200$

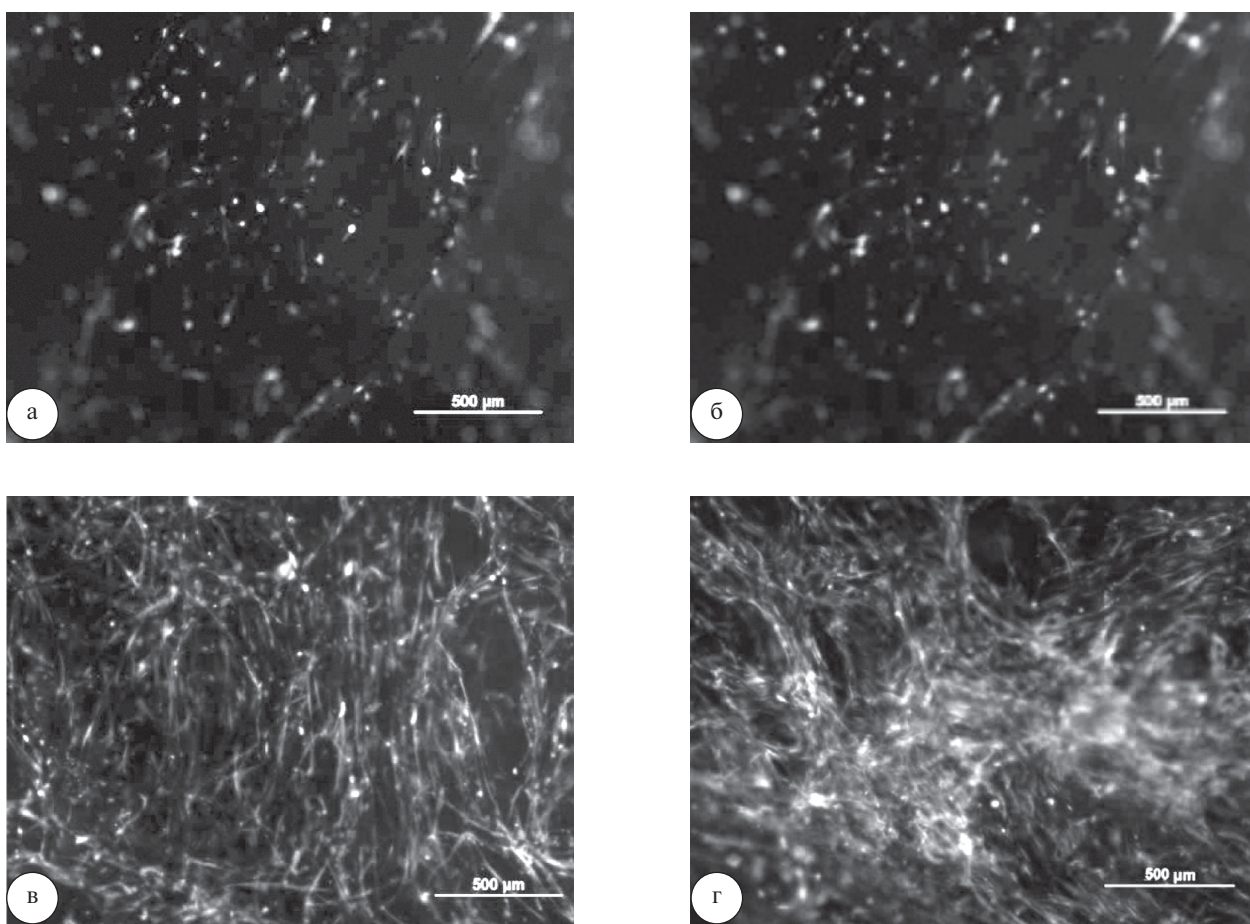


Рис. 5. Увеличение плотности фибробластов на поверхности матрицы ГК и ПК: а – 1-е сутки после посева; б – 8-е сутки после посева; в – 15-е сутки после посева; г – 22-е сутки после посева. Флуоресцентная микроскопия, увел.  $\times 220$

на матрице из ГК и ПК приведены на рисунке 8 и в таблице.

Выявлено, что к исходу 2 суток после посева количество колоний фибробластов на поверхности матрицы ГК на 71–78% меньше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с

культуральным пластиком. Пролиферативная активность разных культур фибробластов индивидуальна и выражается у клеток разных линий в различном времени удвоения популяции –  $t$  (46 ч и 63 ч) и, соответственно, в общем количестве удвоений культуры

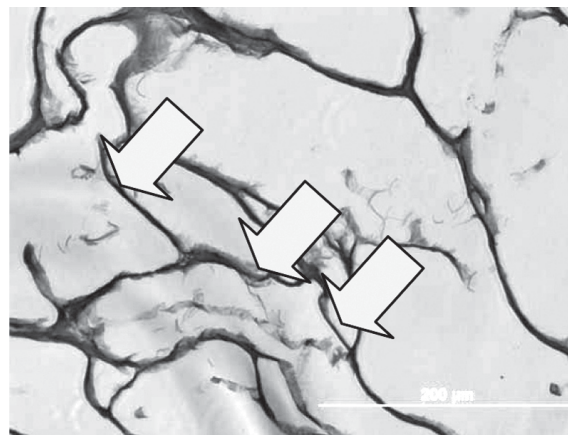
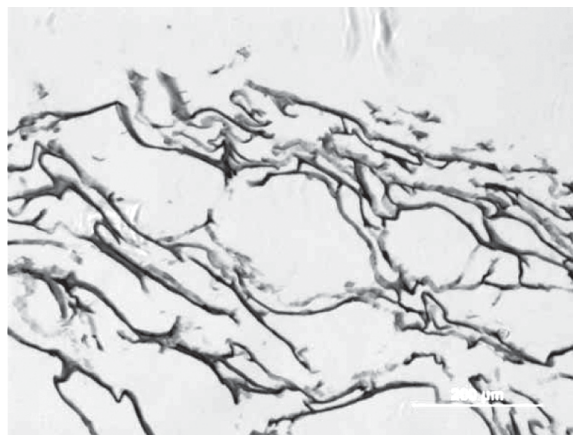


Рис. 6. Культура фибробластов в межклеточном веществе матрицы ГК и ПК. Клетки отмечены стрелками. Окраска гематоксилин-эозином, увел. ×340

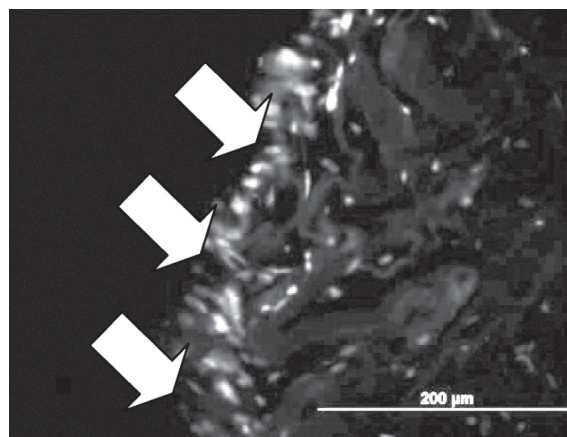
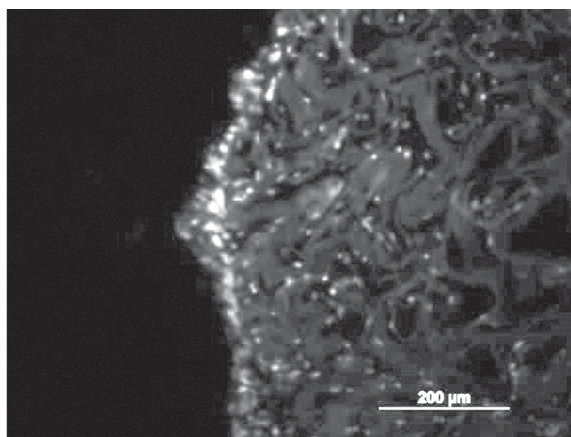


Рис. 7. Культура кератиноцитов на поверхности матрицы ГК и ПК. Ядра клеток отмечены стрелками. Окраска ядер клеток DAPI, , увел. ×360

**Пролиферативная активность культур фибробластов**

Таблица

Линия фибробластов	Показатель	Величина показателей при культивации фибробластов	
		на пластике	на ГК и ПК
F007	Время удвоения популяции, ч	46,7	103,3
	Число удвоений популяций, абс.ч.	2,57	1,17
F006	Время удвоения популяции, ч	63,2	252,9
	Число удвоений популяций, абс.ч.	1,9	0,47

за определенный срок (за 6 суток в 2,57 раз для F007 и 1,9 раз для F006). В обоих наблюдениях клетки на матрице ГК демонстрировали низкое число удвоений популяции (1,17 и 0,47, что на 65 и 76% меньше,  $p < 0,01$ ) по сравнению с результатами при переносе клеток на культуральный пластик. Следовательно, матрица ГК и ПК не оказывает существенного влияния на пролиферативную активность фибробластов.

В сложный последовательный многокомпонентный процесс заживления кожных ран вовлечены

различные клеточные элементы, их деятельность регулируется растворимыми факторами и компонентами внеклеточного матрикса. Фибробласты при культивации в трехмерной матрице синтезируют целый ряд ростовых факторов и цитокинов. Среди многообразия факторов особое значение имеют ряд регуляторных цитокинов и семейство факторов роста фибробластов (фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор роста фибробластов (FGF) и цитокинов (ИЛ 6 и 10) в культуральных средах.

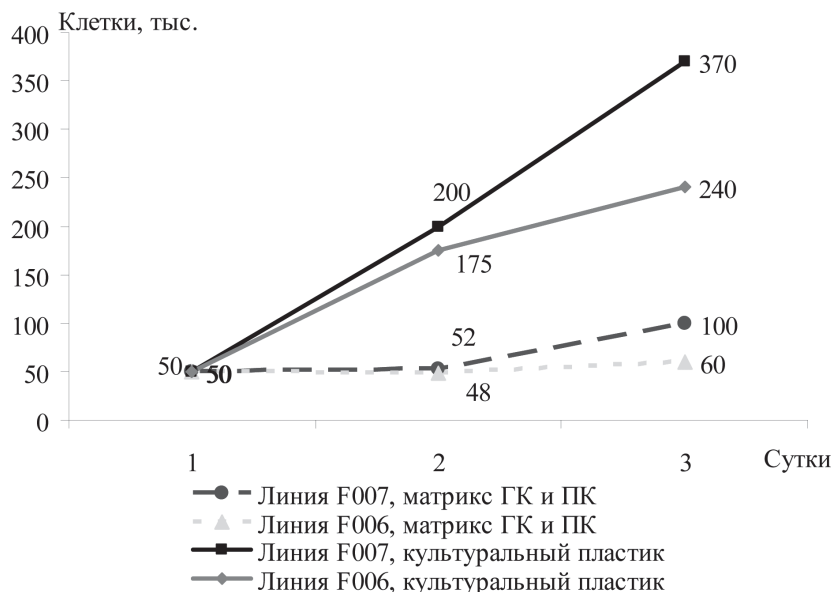


Рис. 8. Динамика роста фибробластов на культуральном пластике и матрице из ГК и ПК

Фактор роста кератиноцитов, известный также как FGF-7, экспрессируется клетками мезенхимального происхождения (фибробластами, стволовыми клетками, гладкомышечными клетками). Оказывает паракринное действие на клетки эпителиального происхождения. Так, в частности, в коже KGF синтезируется дермальными фибробластами и стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки эпидермальных клеток. При раневом заживлении под влиянием факторов воспаления, таких как ИЛ 1 и 6, происходит стимуляция секреции KGF фибробластами [11, 14]. Нами установлено, что при культивации фибробластов на матрице ГК и ПК содержание KGF в среде достоверно изменяется.

В частности, к третьим суткам культивирования при нахождении фибробластов на подложке из разработанной биоматрицы уровень KGF превышал параметры в контроле (на культуральном пластике) на 33,8% ( $p < 0,05$ ), рисунок 9.

### Выводы

1. Матрица ГК и ПК обладает необходимыми условиями для обеспечения адгезии, миграции и пролиферации фибробластов и кератиноцитов, которые распределяются и остаются жизнеспособными как на поверхности, так и в межучастном веществе биополимера, которое не оказывает достоверного влияния на пролиферативную активность клеток кожи.

2. Одновременное культивирование кератиноцитов и фибробластов на матрице ГК и ПК демонстрирует трёхмерное распределение данных клеток по всей структуре биополимера, при этом констатирована миграция фибробластов в глубину материала и формирование на его поверхности эпителиального слоя кератиноцитов.

3. При культивировании фибробластов на матрице ГК и ПК достоверно увеличивается секреция клетками фактора роста кератиноцитов.

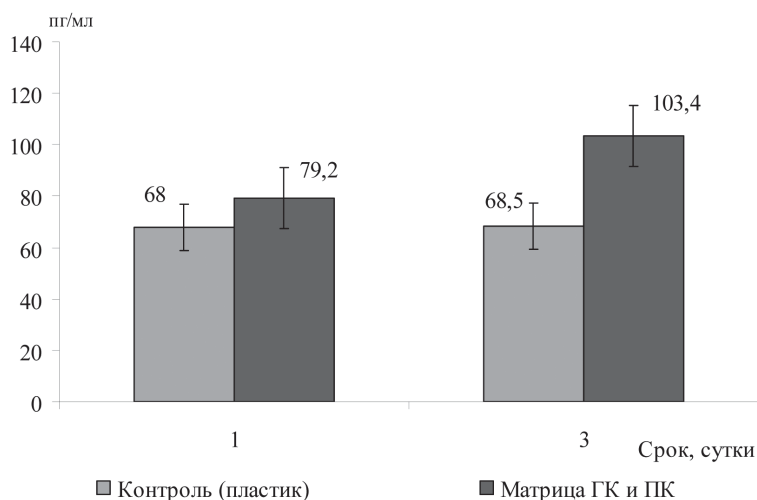


Рис. 9. Содержание KGF в среде культивирования фибробластов

4. Матрицу можно рассматривать как перспективный носитель фибробластов и кератиноцитов, пригодный для создания живого эквивалента кожи.

#### Литература

1. Зиновьев, Е.В. Механотопография и биологические свойства гистоеквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты / Е.В. Зиновьев [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2013. – № 4 (44). – С. 200–204.
2. Рахматуллин, Р.Р. Биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты: биофизические аспекты фармакологических свойств / Р.Р. Рахматуллин // Фармация. – 2011. – № 4. – С. 37–39.
3. Рахматуллин, Р.Р. Разработка целлюлярно-матричного комплекса на основе гиалуроновой кислоты для создания биологически активного раневого покрытия / Р.Р. Рахматуллин [и др.] // Мат. 1-го Национального конгресса по регенеративной медицине. Сборник тезисов. – М., 2013. – С. 213–214.
4. Севастьянов, В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных средств и биоинженерия / В.И. Севастьянов // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – Т. XI, № 3. – С. 14–24.
5. Хабаров, В.Н. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине / В.Н. Хабаров, П.Я. Бойко, М.А. Селянин. – М: Практическая медицина, 2012. – 224 с.
6. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М.: Техносфера, 2007. – 304 с.
7. Терских, В.В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных: Проблемы культивирования и трансплантации / В.В. Терских, А.В. Васильев. – М.: Наука, 1995. – 200 с.
8. Edmonds, M. Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers / M. Edmonds M // Int. j. low. extrem. wounds. – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 11–18.
9. DiDomenico, L. A prospective comparison of diabetic foot ulcers treated with either cryopreserved skin allograft or bioengineered skin substitute / L. DiDomenico, K. Emch, A. Landsman // Wounds. – 2011. – Vol. 23, № 7. – P. 184–189.
10. Cheng, A. Comparison of different ADM materials in breast surgery / A. Cheng, M. Saint-Cyr // Clin. plast. surg. – 2012. – Vol. 39, № 2. – P. 167–175.
11. Caravaggi, C. HYAFF. 11-based autologous dermal and epidermal grafts in the treatment of noninfected diabetic plantar and dorsal foot ulcers: A prospective, multicenter, controlled, randomized clinical trial / C. Caravaggi, R. De Giglio, C. Pritelli // Diabetes care. – 2003. – Vol. 26, № 10. – P. 2853–2859.
12. Gravante, G. Hyalomatrix PA in burn care practice: Results from a national retrospective survey, 2005 to 2006 / G. Gravante, R. Sorge, A. Merone // Ann. plast. surg. – 2010. – Vol. 64, № 1. – P.69–79.
13. Uccioli, L. Two-step autologous grafting using HYAFF scaffolds in treating difficult diabetic foot ulcers: Results of a multicenter, randomized controlled clinical trial with long-term follow-up / L. Uccioli, L. Giurato, V. Ruotolo // Int. j. low extrem. wounds. – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 80–85.
14. Erbatur, S. Comparison of clinical and histopathological results of hyalomatrix usage in adult patients / S. Erbatur, Y. Coban // Int. j. burns trauma. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 118–125.
15. Shridharani, S. A systematic review of acellular dermal matrices in head and neck reconstruction / S. Shridharani, A. Tufaro // Plast. reconstr. surg. – 2012. – Vol. 130, Suppl. 2. – S. 35–43.

E.V. Zinoviev, R.R. Rakhmatullin, A.V. Apchel, K.F. Osmanov, I.A. Almazov, A.A. Sulitsa

#### Bioengineered matrix-based designs on base of hydrogel of hyaluronic acid and peptide complex

**Abstract.** Plastic materials with living cells are the basis for the creation of bioengineered constructs. Our proposed bioplastic material based on hyaluronic acid structured peptide complex is promising from the standpoint of culturing skin cells. It has been established that the material has the necessary conditions for achieving the adhesion, migration and proliferation of fibroblasts and keratinocytes, which remained viable and distributed both on the surface and in the interstitial substance biopolymer. Simultaneous culturing of keratinocytes and fibroblasts on the three-dimensional matrix, the data distribution shows the entire structure of the cell biopolymer. In the culture medium when cultured fibroblasts by enzyme-linked immunosorbent assay showed a significant ( $p < 0,05$ ) increase of 33,8% cell secretion of keratinocyte growth factor to the third day. Bioplastic material based on hyaluronic acid, a hydrocolloid, a peptide complex, collagen type I, and the adhesive peptide arginine-glycine-asparagine can be regarded as a promising design for creation bioengineering – living skin equivalent.

**Key words:** hyaluronic acid, peptide complex bioengineered structure, culturing skin cells, fibroblasts, keratinocytes, cytokine secretion, living skin equivalent.

Контактный телефон: 8 (812) 983-6392; e-mail: evz@list.ru